

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔令和2（2020）年度 研究進捗評価用〕

平成29年度採択分
令和2年3月31日現在

**オルガノイドライブラリーの構築による消化器疾患形質の統合的
理解**

Gaining Integrative Understanding of Gastrointestinal Disease
Phenotypes through Establishment of an Organoid Library

課題番号：17H06176

佐藤 俊朗（SATO, TOSHIRO）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・教授



研究の概要（4行以内）

近年のシーケンス技術の向上により、ゲノム異常を網羅的に解析できるようになったが、疾患の生物学的形質変化への繋がりは依然として理解が乏しい。我々は多数の臨床消化器疾患組織よりオルガノイドを樹立し、ゲノム異常がどのようにして疾患の性質を形作るかを解明する。本研究により消化器疾患の病態解明や治療法開発の進歩が期待できる。

研究分野：消化器病学

キーワード：大腸がん、膵臓がん、胃がん、内分泌細胞がん

1. 研究開始当初の背景

消化器疾患の多くは遺伝学的な変化とその環境に対する応答によって生じる形質（Phenotype）と解釈することができる。遺伝子-外的環境の相互作用は組織形態異常を誘導し、個体レベルの症候を投影する。近年のシーケンス技術の進歩は遺伝学的変化（Genotype）とそれに付随するエピゲノム、トランスクリプトームなどの統合的理解を深めた。しかしながら、こうした Genotype データをどのように疾患形質に結び付けることを目的とした Genotype-Phenotype 研究は依然として未確立である。

2. 研究の目的

ヒト疾患 Genotype-Phenotype 研究手法を展開する上で、ヒト組織解析系の欠如が永らく研究進展のボトルネックとなってきた。我々は、オルガノイド技術と呼ばれる細胞組織システムの体外再構築を先駆的に開発し（Sato T et al. Nature 2009）、従来の Genotype 研究では演繹できなかった知見を見出した（Sato T et al. Nature 2011, Matano M et al. Nature Medicine 2015, Shimokawa M et al Nature 2017）。本技術は幅広いヒト消化器疾患に応用され、国際的にも極めて高い注目を集めている。本研究は、上記の学術的背景を基に、多様な疾患組織上皮を包むオルガノイドライブラリーを構築し、疾患 Genotype-Phenotype 研究の研究基盤整備を行う。

3. 研究の方法

我々は研究期間内に達成を見込む3つのマイルストーンを設定し、戦略的な研究推進を行う。

（1）消化器疾患オルガノイドライブラリーの構築、大腸がん、胃がん、膵がん、などの消化器がん患者からがん組織を収集し、培養オルガノイドとする。さらに、ゲノム解析、遺伝子発現解析などの包括的な分子解析を行う。また、樹立したオルガノイドは *in vitro* およびマウス異種移植系による疾患形質の解析を行う。これらの方法により、患者組織の Genotype-Phenotype データベースを構築する。

（2）ゲノム編集システムによる Genotype-Phenotype 解析系の確立、上記で得られた疾患形質を正常の組織由来オルガノイドに遺伝子変異を加えていくことで疾患の再現を行う。遺伝子変異導入は CRISPR-Cas9 ゲノム編集や、遺伝子過剰発現系などを用いる。さらに、蛍光レポーターを用いて、特定の遺伝子を可視化させ、当該遺伝子発現細胞の挙動、細胞系譜解析などを行う。

（3）薬剤感受性形質の多次元的理解と予測アルゴリズムの創出。上述の疾患組織由来オルガノイドやゲノム編集による人工疾患組織細胞、および遺伝子可視化システムなどを用い、臨床で用いる薬剤の感受性と相関のあるゲノム異常や形質変化を解析する。さらには、実際の臨床患者データとの相関性解析を行う（尚、介入研究とはしない）

4. これまでの成果

(1) 消化器疾患オルガノイドライブラリーの構築 37 例の胃がん組織よりオルガノイドを樹立し、包括的な分子解析を行った(文献3)。さらに、胃がんの多くが Wnt と R-spondin と呼ばれる増殖因子への依存性を示し、治療標的となりうることを実証した。現在、合計 50 例以上の胃がんオルガノイドを樹立しており、さらなる研究成果が期待できる。39 例の膵がん組織よりオルガノイドを樹立し、包括的な分子解析を行った(文献4)。膵がんの中でも特に予後不良な Basal 型膵がんの悪性化メカニズムおよび特徴的な増殖因子非依存性を解明し、新しい標的治療薬の開発のシーズを得た。潰瘍性大腸炎の炎症上皮からオルガノイドを樹立し、全エクソン解析より、炎症部位に特異的に獲得する体性遺伝子変異群の存在を明らかにした。これらの遺伝子変異はいずれも炎症性サイトカインである IL17 シグナルと関連しており、潰瘍性大腸炎上皮の環境適応的な変異形成メカニズムを解明した(文献1)。こうした多数の疾患組織オルガノイド樹立の経験と、生体組織環境の理解に基づき、ヒト大腸オルガノイドのより最適化した培養技術を開発、報告した(文献2)。

(2) ゲノム編集システムによる Genotype-Phenotype 解析系の確立 最適化した培養技術と遺伝子導入技術によって、効率的なオルガノイドのゲノム編集が可能となった。本技術により、胃がんおよび膵がんの新しい Genotype-Phenotype 連関を実証した。胃がんでは CDH1 変異と TP53 変異によって R-spondin 非依存増殖を導くこと、膵がんでは GATA6 の発現低下とともに Wnt 非依存性増殖を導くことを実証した(文献3, 4)。さらに、LGR5 遺伝子を発現するヒト正常上皮細胞を遺伝子組み換え酵素である CreER で標識し、その子孫細胞の系譜解析を用いて行った。マウス大腸への異種移植技術によって LGR5 陽性細胞がヒト大腸幹細胞として機能することを実証した(文献5)。

(3) 薬剤感受性形質の多次元的理解と予測アルゴリズムの創出。

既に樹立した大腸がんオルガノイドライブラリー (Fujii *et al.* Cell Stem Cell 2016) を用い、薬剤に対する感受性の定量解析システムを開発した。また、同様に前述の膵がんオルガノイドライブラリーを用いて同様の薬剤感受性スクリーニングを行った。現在、薬剤感受性の定量データと相関する分子データとの統合解析を行い、薬剤感受性 Phenotype を制御する Genotype の抽出している。また、患者臨床データと *in vitro* オルガノイド薬剤感受性データを取得した。

5. 今後の計画

これまでの研究で構築した研究基盤を活用し、より詳細な消化器疾患形質の追及を行い、Genotype-Phenotype 研究の推進を図る。また、これまでのオルガノイドライブラリーに、より難治性または希少な消化器がんを中心に拡充していく。さらに、薬剤感受性形質のさらなる解析技術向上と臨床データ予測の精緻化を図る。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

- 1) Nanki K, Fujii M, (他 18 名), ***Sato T.** Somatic inflammatory gene mutations in human ulcerative colitis epithelium. **Nature.** 2020;577:254-259.
- 2) Fujii M, Matano M, (他 5 名), ***Sato T.** Human Intestinal Organoids Maintain Self-Renewal Capacity and Cellular Diversity in Niche-Inspired Culture Condition. **Cell Stem Cell.** 2018 ;23:787-793.
- 3) Nanki K, Toshimitsu K, Takano A, (他 19 名), ***Sato T.** Divergent Routes toward Wnt and R-spondin Niche Independency during Human Gastric Carcinogenesis. **Cell.** 2018;174:856-869.
- 4) Seino T, (他 17 名), ***Sato T.** Human Pancreatic Tumor Organoids Reveal Loss of Stem Cell Niche Factor Dependence during Disease Progression. **Cell Stem Cell.** 2018 ;22:454-467.
- 5) Sugimoto S, (他 10 名), ***Sato T.** Reconstruction of the human colon epithelium *in vivo*. **Cell Stem Cell** 2018;22:171-176
2018 年 第 14 回日本学術振興会賞
2018 年 第 14 回日本学士院学術奨励賞

7. ホームページ等

<https://organoidmed.org/>